



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
*Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología*

Implicaciones del esparcimiento múltiple y la pérdida de simbiotes sobre el foto daño inducido por radiación ultravioleta en *Orbicella faveolata*

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA  
Sergio David Guendulain García

TUTOR  
Dra. Anastazia T. Banaszak  
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dr. Roberto Iglesias Prieto  
Dra. Susana Enríquez  
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA  
Dr. Antonio Peña Díaz  
Dr. Eugenio Méndez  
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

MÉXICO, D. F. ENERO 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Al maestro Jesús**

## **Agradecimientos**

A CONACyT por el apoyo económico otorgado durante mis estudios de posgrado.

A mi directora de tesis, para quien no tengo palabras para agradecer la ayuda brindada.

A mi comité tutorial, por enriquecer el presente trabajo con todas las observaciones y por su disponibilidad de ayudar.

De manera especial agradezco a la Dra. Patricia Thomé, quien a pesar de no ser parte oficial del comité tutorial, siempre estuvo dispuesta a colaborar; por aceptarme como discípulo, por la paciencia y las muy buenas recomendaciones. Al M. en C. Luis Parmenio (NR), por todo el soporte en el laboratorio. De igual manera a Claudia Tatiana, quien nunca dudo en ayudarme, ser pieza clave en la realización de este trabajo y por brindarme su amistad durante todos estos años.

Al Servicio de Hidrografía y Meteorología de la UASA, ICMYL-UNAM, por proveer los datos de irradiancia. Así como al M. en C. Edgar Escalante Macera, por su auxilio en el procesamiento de los datos.

Al laboratorio de la Dra. Susana Enríquez, del Dr. Roberto Iglesias Prieto, y de la Dra. Patricia Thomé por el préstamo de material, equipo y espacio para trabajar.

Al Capitán Amauri por el apoyo brindado para la recolecta de las muestras.

A los compañeros del grupo de fotobiología: Sandra, Tim, Román, Miguel, Luis (ito), Tatis, Serguei y a Gaby Pekas (aunque no sea fotobióloga), por la ayuda brindada desde las diferentes trincheras.

A mi familia, que siempre me ha acompañado a pesar de la distancia, por darme ánimos para seguir adelante, en particular a doña Sandra y a la maestra mari, por el soporte en la parte final de esta tesis.

A Israel (Mac), Gabriel Rosado y Monse por su ayuda en la impresión.

A todos y cada uno de ustedes pues sin su participación, este trabajo no hubiera sido posible o placentero.

## Índice

I.- Resumen .....	1
II.- Introducción .....	2
III.- Hipótesis .....	5
IV.- Objetivos.....	5
V.- Material y métodos.....	6
V.1.- Toma de muestras.....	6
V.2.- Inducción de blanqueamiento .....	7
V.3.- Exposiciones a RUV.....	8
V.3.1.- Exposición a radiación solar simulada.....	8
V.3.2.- Exposición a radiación solar natural.....	9
V.4.- Extracción de ADN y cuantificación de CPDs .....	10
V.5.- Detección del daño .....	11
V.6.- Cuantificación .....	11
V.7.- Densidad de simbiontes y <i>Cl a</i> .....	12
V.8.- Análisis de datos.....	13
VI.- Resultados.....	14
VI.1.- Espectros de reflectancia de corales intactos.....	14
VI.2.- Formación de CPDs en <i>O. faveolata</i> .....	16
VII.- Discusión .....	19
VIII.- Conclusión.....	22
IX.- Referencias .....	23
Anexo I.- Exposición de pUC19 a UV-C y determinación de CPDs formados .....	28
Anexo II.- Representación gráfica de la cámara Neubauer, se muestran los campos W .....	30

## Índice de figuras

- Figura 1.-** Mapa del área de recolecta de *Orbicella faveolata*. ..... 6
- Figura 2.-** Espectros de las fuentes de luz utilizadas para las medidas de reflectancia. (A).- Combinación de lámpara de UV-B y UV-A. (B).- Combinación de lámpara UV-A y PAR. 7
- Figura 3.-** Características lumínicas del simulador solar. (A).- Espectro de irradiancia del simulador solar. (B).- Detalle de la porción de RUV. (C).- Distribución espacial de la irradiancia emitida por el simulador solar (integrado 300 a 400 nm). ..... 9
- Figura 4.-** Espectros de transmitancia (%) de los filtros utilizados durante la exposición a luz natural. Filtro opaco al UV (línea continua) y filtro transparente al UV (línea discontinua). 10
- Figura 5.-** Ejemplo de una curva de calibración para la cuantificación de dímeros de timina. (A).- Variación en la intensidad de color debida a la variación en la cantidad de pUC19. (B).- Determinación de la ecuación que explica modificaciones en el número de dímeros en función a la intensidad de color. .... 12
- Figura 6.-** Espectros de reflectancia de *O. faveolata*, en línea discontinua se muestra la reflectancia del esqueleto y en línea continua un coral pigmentado, la línea vertical muestra el cambio de lámparas. .... 14
- Figura 7.-** (A).- Comparación de espectros de absorción ( $\text{Log}(1/R)$ ) de corales intactos pigmentados (línea continua) y blanqueados (línea discontinua), la línea vertical muestra el cambio de lámparas. (B).- Segunda derivada de 280 nm a 363 nm, los datos se encuentran transformados positivamente. (C).- Densidad de células simbiotas en corales blanqueados y pigmentados. (D).- Densidad de clorofila *a* en corales blanqueados y pigmentados. ■.- Corales Pigmentados, □.- Corales blanqueados. (media  $\pm$  D.E). .... 15
- Figura 8.-** Formación de CPDs en corales intactos blanqueados (símbolo blancos) y pigmentados (símbolos negros). (media  $\pm$  D.E). (A).- Formación de dímeros de timina promedio en corales blanqueados y pigmentados. (B).- Formación de dímeros de timina por exposición. .... 16
- Figura 9.-** Comportamiento de la radiación solar el día de la exposición. (A).- Radiación ultravioleta (valor integrado de 320 a 400 nm, en  $\text{W.cm}^{-2}$ ). (B).- Radiación fotosintéticamente activa (valor integrado de 300 a 750 nm). .... 17
- Figura 10.-** Formación de dímeros de timina en corales intactos del tratamiento y en corales control. . ■ .- Corales pigmentados, □ .- Corales blanqueados. Las letras muestran las diferencias significativas. (media + D.E). .... 18

**Figura 11.-** Espectro del simulador solar en la región ultravioleta (línea continua).  
Aproximación del incremento debido a la reflectancia del esqueleto coralino (línea discontinua).  
.....20

**Índice de tablas**

**Tabla 1.-** Valores integrados de RUV durante las exposiciones a luz solar simulada (300 a 400 nm) y valores promedio de formación de dímeros para corales blanqueados y pigmentados.16

**Tabla 2.-** Valores integrados de RUV durante las exposiciones a radiación solar natural (300 a 400 nm) y valores promedio de formación de dímeros para corales blanqueados y pigmentados.  
..... 18

## **I.- Resumen**

Los corales escleractíneos han sido descritos como uno de los colectores de luz más eficientes de la naturaleza. Sus propiedades ópticas derivan de la capacidad del esqueleto coralino de esparcir la luz incidente, incrementando la probabilidad y eficiencia de absorción de luz de los dinoflagelados simbioses. No obstante este esparcimiento no es selectivo, por lo que incrementa también la probabilidad de absorción de radiación ultravioleta (RUV <400 nm) y sus efectos negativos sobre los corales escleractíneos. A nivel molecular, el principal efecto es la formación de dímeros de piridina de ciclobutano (CPDs por sus siglas en inglés), lo que interfiere en la replicación y traducción de ADN. En la presente investigación se determinó el daño total ((dímeros/Mb)/ $\mu$ g) inducido por la exposición a RUV en organismos blanqueados y pigmentados del coral *Orbicella faveolata*, mediante inmunodetección. La exposición a RUV se hizo bajo condiciones solares simuladas y naturales. Los resultados confirmaron que el daño total inducido por la RUV es mayor en corales blanqueados que en corales pigmentados, poniendo en evidencia la importancia del esparcimiento múltiple sobre el esqueleto de coral en el incremento del daño al ADN y el papel fotoprotector que juegan las células simbioses para el holobionte en ambientes someros tropicales con alta incidencia de RUV.



## II.- Introducción

Los corales hermatípicos son invertebrados marinos del filum Cnidaria, agrupados en el orden Scleractinia, dentro de la clase Anthozoa. Se les consideran organismos coloniales, puesto que estructuralmente, se encuentran organizados en unidades modulares repetitivas, pólipos, que poseen un alto grado de comunicación interna (Smith 1948, Jordán Dahlgren 1993). Esta propiedad les confiere una serie de ventajas entre las que destacan: plasticidad morfológica, crecimiento clonal vegetativo y la integración funcional a través de la translocación de sustancias entre los pólipos, constituyendo una unidad fisiológica y ecológicamente funcional (Jordán Dahlgren 1993).

Debido a sus altas tasas de calcificación, los corales escleractíneos son fundamentales en la formación de arrecifes (Veron 2000). Estructural y funcionalmente brindan beneficios ecológicos, sociales y económicos a las poblaciones humanas (Moberg and Folke 1999), como la protección costera de los efectos producidos por tormentas y huracanes; su participación en los ciclos biogeoquímicos, además de ser los responsables de mantener el alto valor paisajístico de estos ambientes para la industria turística (Done *et al.* 1996, Remoundou *et al.* 2009). Por otra parte, diversos estudios han propuesto que el conjunto arrecifal posee tal diversidad biológica que lo hace comparable con las selvas tropicales (Reaka Kudla 1997).

A lo largo de 200 millones de años, los corales escleractíneos simbióticos han sido los organismos dominantes en aguas tropicales someras y oligotróficas (Stanley y Swart 1995). Su éxito ecológico se le atribuye principalmente a su asociación con algas unicelulares fotosintéticas del género *Symbiodinium*, que se alojan en los tejidos coralinos y son capaces de transformar en materia orgánica la energía radiante proveniente del sol, en longitudes de onda que van desde de los 400 nm a los 700 nm, conocida como radiación fotosintéticamente activa (PAR por sus siglas en inglés) (Trench 1979).

En corales simbióticos, una gran parte del carbono fijado durante la fotosíntesis por los simbiontes se integra al coral en forma de glicerol, glucosa o alanina, cubriendo del 90 al 100% de las necesidades metabólicas del hospedero (Muscatine 1967). El alga por su parte aprovecha los desechos nitrogenados y el CO<sub>2</sub> del metabolismo de los corales (Harland *et al.* 1992, Muscatine y Weis 1992).

Por otra parte, la interacción entre la luz y el esqueleto coralino provoca un campo difuso de luz, incrementando la probabilidad y eficiencia de absorción de un fotón incidente por un pigmento, esta propiedad es denominada esparcimiento múltiple y representa una ventaja evolutiva para los corales en ambientes donde la disponibilidad de nutrientes es reducida (Enríquez *et al.* 2005).

El esparcimiento múltiple de la luz, ha permitido a los corales ser los organismos más eficientes en absorber la luz y utilizarla para el proceso fotosintético, (Enríquez *et al.* 2005). La eficiencia de utilizar la luz como recurso clave en un ambiente oligotrófico, explica el éxito de estos organismos en ambientes pobres en nutrientes. No obstante, el esparcimiento múltiple no es selectivo pudiendo incrementar la eficiencia de absorción de luz de todas las longitudes de onda, sean benéficas como en el caso del PAR o nocivas como la RUV, perjudicando sistemas biológicos.

En ambientes tropicales someros donde la RUV es muy abundante, esto puede ser una fuerte presión ambiental (Jokiel 1980, Lesser y Lewis 1996, Lesser y Farrel 2004). La RUV se ha dividido en RUV-A (320-400 nm), RUV-B (280-320 nm) y la RUV-C (<280 nm), sin embargo, esta última se considera ecológicamente irrelevante ya que es absorbida por los componentes de la atmósfera como el oxígeno y ozono (Whitehead *et al.* 2000).

Se han descrito un gran número de efectos adversos de la RUV sobre los sistemas biológicos, considerando que el daño puede ser directo, o indirecto como en el caso de la formación de radicales libres de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). En conjunto los daños causados ejercen un fuerte control sobre la estructura de la comunidad (Helbling *et al.* 1992, Banaszak 2007, Dahms y Lee 2010). En comunidades coralinas por ejemplo, se han desarrollado estudios de los efectos nocivos de la RUV sobre la epifauna coralina (Jokiel 1980), así como disminuciones de la tasa fotosintética y crecimiento de las poblaciones de *Symbiodinium* (Jokiel y York 1982, Lesser y Shick 1989), de igual manera se han observado decrementos en las tasas fotosintéticas en *Pocillopora damicornis* al estar expuesta a RUV (Lesser y Lewis 1996). Por otra parte, se ha reportado inhibición de la reproducción sexual en *Acropora cervicornis* (Torres *et al.* 2008). Durante la etapa planular, las larvas coralinas permanecen en la superficie del agua, exponiéndose a altas dosis de RUV diariamente (Banaszak y Lesser 2009), provocando disminuciones considerables en la supervivencia (Gleason y Wellington 1995, Häder *et al.* 1998).

A nivel molecular, la formación de cis-syn dímeros de piridina de ciclobutano (CPDs por sus siglas en inglés), o dímeros de timina, es la principal alteración, que ocurre hasta en un 80% de los casos. Sin reparación, este daño puede llegar a interferir con la replicación y traducción de ADN (Banaszak 2007, Häder *et al.* 2007, Dahms y Lee 2010). Al respecto, se ha descrito la formación de CPDs en corales intactos bajo condiciones de luz simuladas y naturales por medio de inmunodetección, concluyendo que la formación es dependiente de la dosis (Anderson *et al.* 2001) y que el estrés térmico puede ser un factor que contribuya a su formación (Lesser y Farrell 2004, Fitt *et al.* 2009).

Si bien son múltiples y letales los efectos nocivos de la RUV, los organismos, además de mecanismos de reparación, han desarrollado mecanismos para protegerse de esta radiación, en especial aquellos que se encuentran más expuestos a ella. Dichas estrategias implican el uso de bloqueadores de RUV, ya sean físicos, o químicos, como la síntesis de compuestos con capacidad de absorber radiación en longitudes de onda de la RUV (Banaszak y Neale 2001). Los compuestos más conocidos producidos por algas marinas y bacterias son las micoesporinas parecidas a aminoácidos (MAAs, por sus siglas en inglés). Estas poseen un pico de absorción entre los 309 nm y los 360 nm; no obstante, poseen nula absorción en la región del PAR. Se ha sugerido que en los organismos simbiotes estos compuestos son sintetizados por los organismos fotosintéticos y de alguna manera trasladados a los hospederos (Banaszak y Trench 1995). Shibata (1969) fue el primero en descubrir estos componentes en los corales, y hasta la fecha se han identificado en estos 11 de los 20 MAAs registrados (Banaszak 2003).

A pesar de la importancia de la RUV, todavía no se ha explorado el efecto de la interacción de la RUV con el esqueleto, y sus repercusiones al tejido coralino. Por este motivo, la presente investigación pretende evaluar el papel que juega la amplificación de la RUV debido al esparcimiento múltiple, mediante la cuantificación del el daño inducido al ADN en *Orbicella faveolata* además de estimar la importancia de la presencia de simbiotes como agentes fotoprotectores. Esto permitiría arrojar nueva luz sobre la magnitud del impacto de la RUV sobre los corales escleractíneos, especialmente durante los eventos de blanqueamiento.

### **III.- Hipótesis**

Debido a la disrupción de la simbiosis a causa del blanqueamiento coralino, el hospedero se vuelve vulnerable a los efectos inducidos por la radiación ultravioleta, por lo tanto se espera que los corales blanqueados presenten mayor daño en el ADN debido a la disminución de las densidades de *Symbiodinium* y por el efecto del esparcimiento múltiple sobre la superficie del esqueleto de coral.

### **IV.- Objetivos**

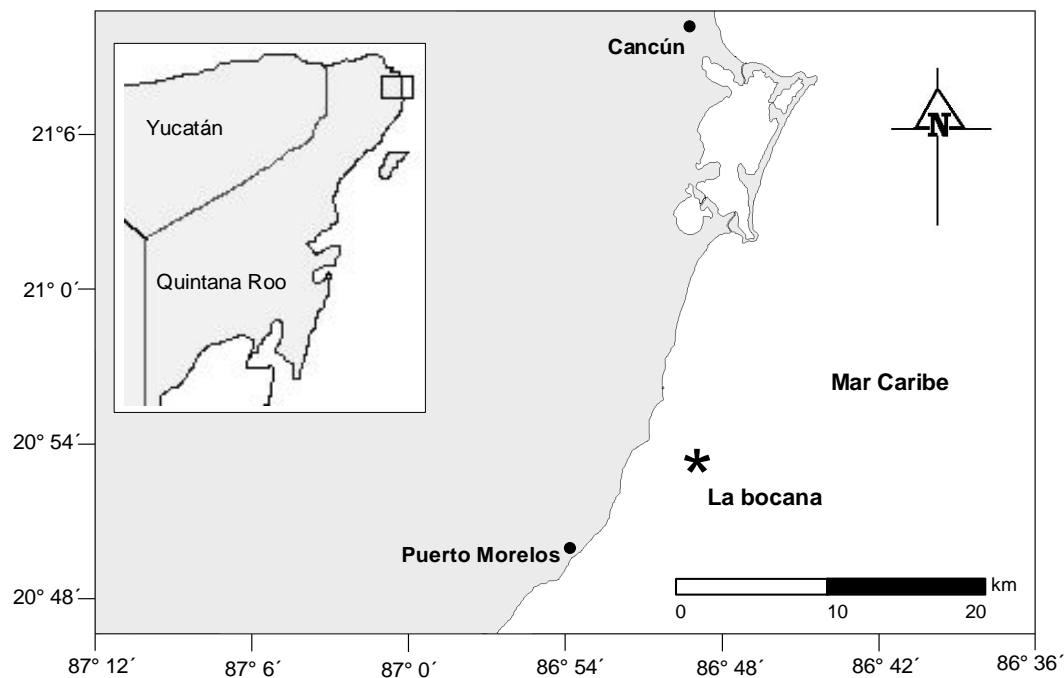
Comparar el daño en el ADN de *Orbicella faveolata* inducido por radiación ultravioleta mediante la cuantificación de dímeros de timina (CPDs) en corales blanqueados y pigmentados bajo condiciones de luz natural y simulada.

Valorar el papel del esparcimiento múltiple y la pérdida de simbiontes como mecanismos que incrementen dicho daño.

## V.- Material y métodos

### V.1.- Toma de muestras

Mediante buceo autónomo, se muestrearon tres colonias de 40 cm<sup>2</sup> (aprox.) de *Orbicella faveolata* en la localidad conocida como “La Bocana” (Fig. 1) en el Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos, perteneciente al Sistema Arrecifal Meso-Americano. Las muestras se transportaron al laboratorio de la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales, ICMyL, UNAM en donde se fraccionaron en piezas de aprox. 2 cm<sup>2</sup> y se colocaron en un estanque con flujo continuo de agua de mar a 28° C para su aclimatación hasta su uso experimental. Para bloquear la exposición de los organismos a RUV se colocaron placas de acrílico (acrílico plexiglass UF-3). Así mismo, se colocaron mallas de sombra para reducir la luz incidente (400-750 nm) y simular las condiciones de la profundidad a la cual fueron colectados. La temperatura del agua en los estanques fue monitoreada a través de termógrafos sumergibles (HOBO Data Logger UA-002-64) programados para tomar datos cada 10 minutos.

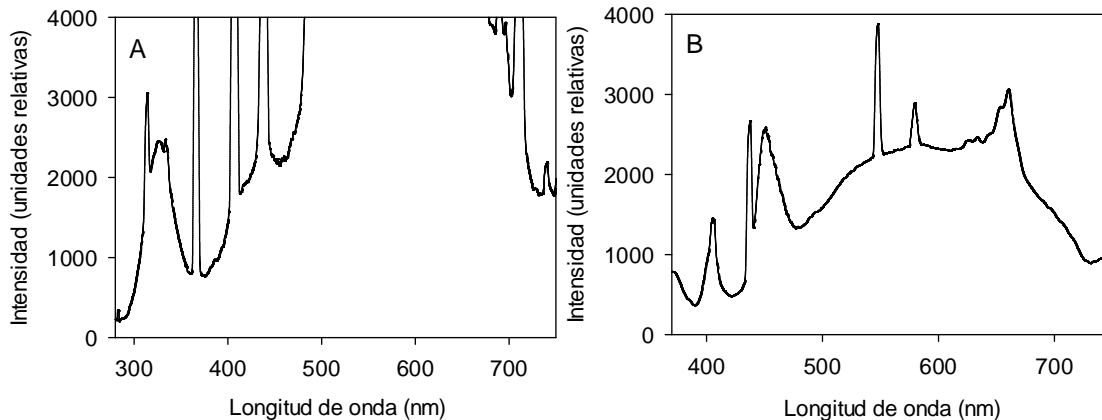


**Figura 1.-** Mapa del área de recolecta de *Orbicella faveolata*.

## V.2.- Inducción de blanqueamiento

Pasados siete días en aclimatación, 27 fragmentos de coral fueron sometidos a estrés térmico con el fin de inducir un estado de blanqueamiento. Para dicho propósito se acondicionó un estanque con flujo continuo donde la temperatura del agua se incrementó a 32° C ( $\pm 0.5^\circ$  C) utilizando un calentador (Process Technology).

Para cuantificar el nivel de blanqueamiento se estimó la absorción de luz a 675 nm a partir de mediciones de reflectancia (Enríquez *et al.* 2005), utilizando el valor de absorbancia de 0.2 como criterio de blanqueamiento. Los espectros de reflectancia se midieron mediante un espectrómetro (Ocean Optics USB 4000, USA) conectado a una fibra óptica (diámetro de 300  $\mu$ m) en un intervalo espectral de 280 nm a 750 nm. La fibra óptica y la fuente de luz se colocaron con un ángulo de inclinación de 45° respecto a la superficie del coral de acuerdo a lo descrito por Enríquez *et al.* (2005). Para determinar dichos espectros se utilizó una combinación de diferentes fuentes de luz: una lámpara de UV-B y UV-A para la parte del espectro que corresponde de 280 a 370 nm y una lámpara de UV-A y PAR para el resto del espectro (370-750 nm) (Fig. 2).



**Figura 2.-** Espectros de las fuentes de luz utilizadas para las medidas de reflectancia. (A).- Combinación de lámpara de UV-B y UV-A. (B).- Combinación de lámpara UV-A y PAR.

### **V.3.- Exposiciones a RUV**

Para determinar el incremento en la formación de CPDs debido a la exposición de los organismos a RUV, se cuantificó el daño en corales blanqueados y pigmentados expuestos a dosis de RUV bajo condiciones simuladas y naturales.

#### **V.3.1.- Exposición a radiación solar simulada**

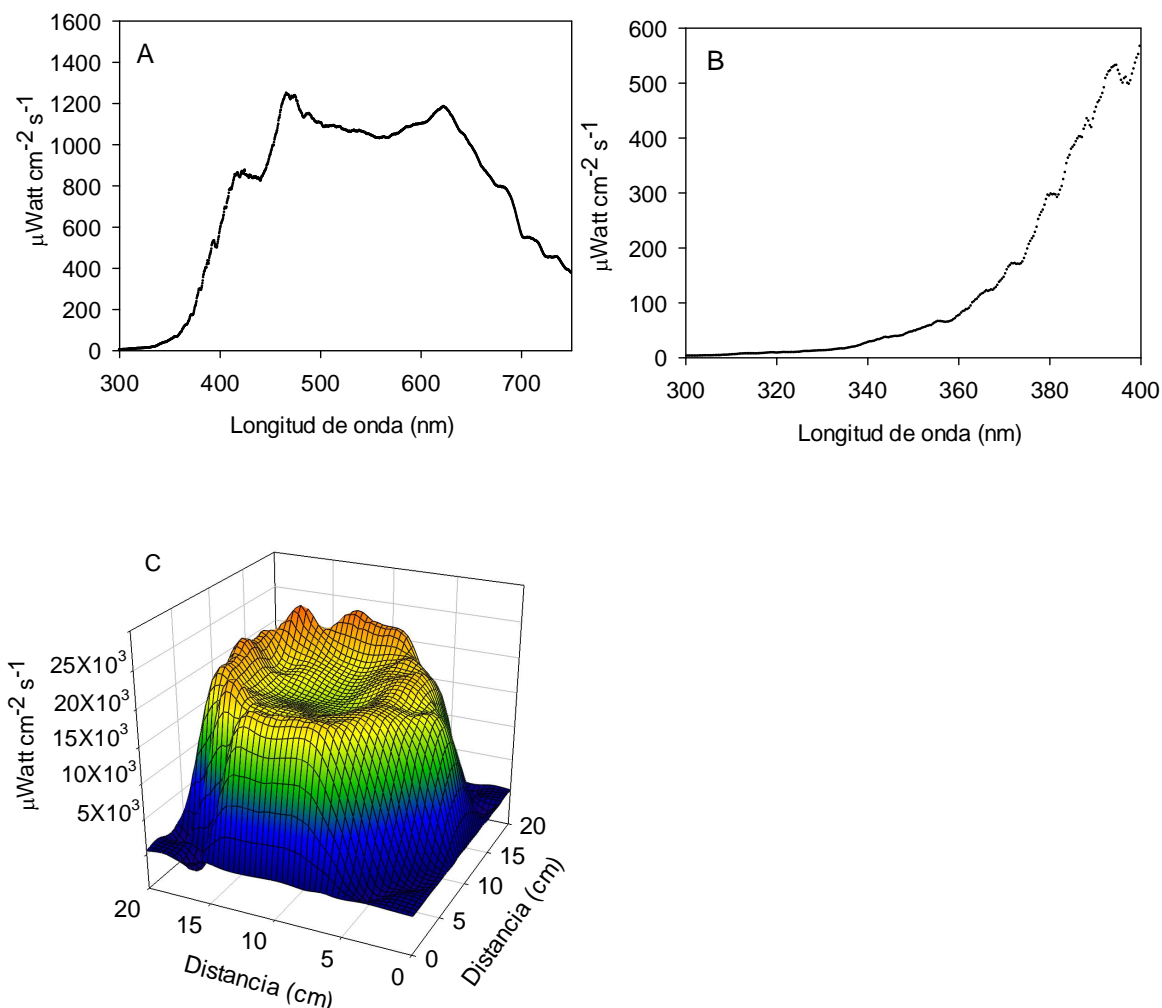
Por triplicado, corales pigmentados y blanqueados se expusieron por 2, 6 y 8 horas a RUV mediante un simulador solar, el cual cuenta con una lámpara de Xenon de 1000 W conectado a una fuente de energía LPS-256 SM (Spectral Energy, USA).

Se determinó la irradiancia emitida por el simulador solar, (RUV 300-400 nm) por medio de un espectrómetro (Ocean Optics, USB 4000, USA) conectado a una fibra óptica con un corrector coseno (Fig. 3A-C). Este sistema se calibró mediante una lámpara LS-Call (Ocean Optics). Durante la exposición, la temperatura del agua se controló con un termocirculador manteniéndola a 28° C.

La exposición a RUV durante los experimentos se cuantificó de acuerdo a la fórmula:

$$\text{Exposición de luz} = E \times \Delta t$$

En donde E es el nivel de irradiancia utilizado durante el experimento, y  $\Delta t$  es el tiempo de exposición.



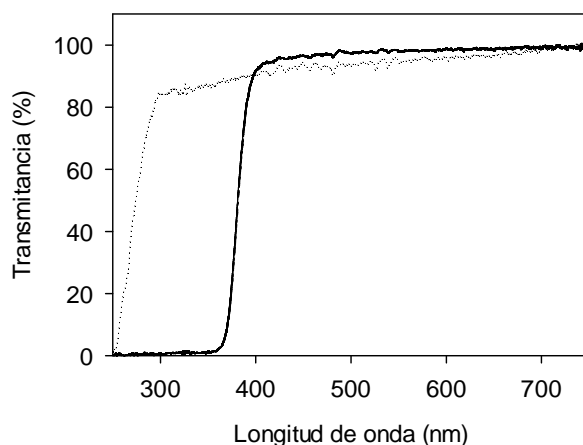
**Figura 3.-** Características lumínicas del simulador solar. (A).- Espectro de irradiancia del simulador solar. (B).- Detalle de la porción de RUV. (C).- Distribución espacial de la irradiancia emitida por el simulador solar (integrado 300 a 400 nm).

### V.3.2.- Exposición a radiación solar natural

Para la exposición a radiación solar natural, se habilitaron dos estanques con flujo continuo de agua de mar que se mantuvo a 28° C. Los estanques se cubrieron con placas de acrílico transparente a RUV (acrílico plexiglass G UVT) y opaco a RUV (acrílico plexiglass UF-3) para los corales control (Fig. 4). Nueve organismos blanqueados (n=9) y pigmentados (n=9), por estanque se expusieron durante nueve horas a radiación solar natural.



Durante la exposición, la irradiancia (PAR; 400-700 nm) se registró cada cinco minutos (promediando el valor por segundo durante un minuto) usando un sensor corregido por coseno (Li-Cor, LI-192, USA). La cantidad de RUV (300-400 nm), se determinó mediante un espectrómetro (Ocean Optics, USB 4000) conectado a una fibra óptica con un corrector coseno, calibrado mediante una lámpara LS-Call (Ocean Optics), registrando los valores de irradiancia cada cinco minutos.



**Figura 4.-** Espectros de transmittancia (%) de los filtros utilizados durante la exposición a luz natural. Filtro opaco al UV (línea continua) y filtro transparente al UV (línea discontinua).

#### **V.4.- Extracción del ADN y cuantificación de CPDs**

Después de exponer los organismos a RUV, los fragmentos fueron congelados con hielo seco y etanol a  $-70^{\circ}\text{C}$ , y una vez congelados fueron preservados a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis. Con el fin de inhibir las ADNasas, los fragmentos de coral se sumergieron en 100 mM Tris pH 8, 100 mM EDTA, 500 mM NaCl y 1% Triton X-100. Posteriormente el tejido se extrajo con aire a presión y búfer de extracción (25 mM citrato de sodio, 5 mM EDTA). El extracto se procesó con un homogeneizador de tejidos de vidrio y se centrifugó a 5000 rpm por 5 min. El precipitado se conservó para determinar la densidad de simbiontes y de clorofila *a* (Chl *a*), mientras que el sobrenadante se incubó durante una hora a  $50^{\circ}\text{C}$  con tiocianato de guanidina (4 M), DTT (50 mM), Triton X-100 (1%) y proteinasa K (500  $\mu\text{g/ml}$  concentración final). La extracción se realizó con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se precipitó con dos volúmenes de etanol (100%), y posteriormente se

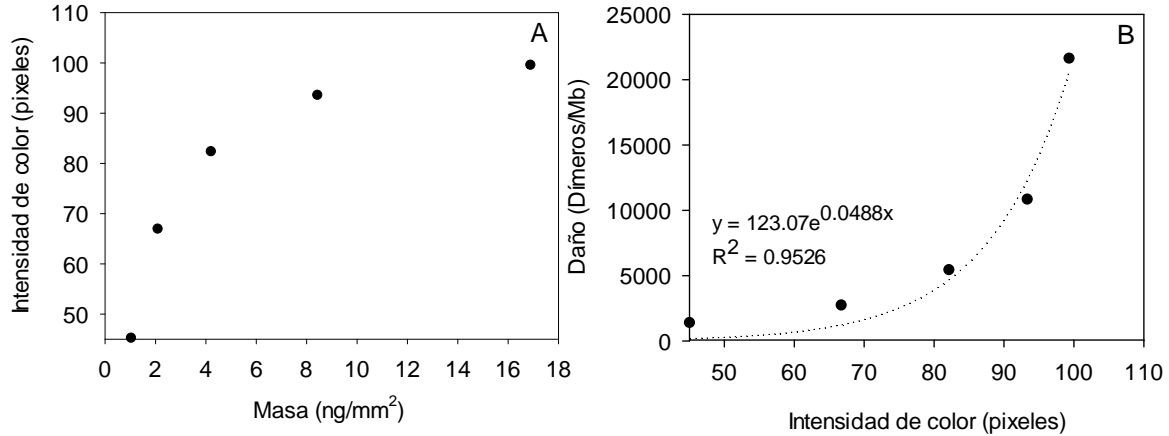
lavó con etanol al 70%. El extracto se resuspendió en 1 ml de solución TE. Las concentraciones de ADN se determinaron mediante un espectrofotómetro NanoDrop (ND-1000).

#### **V.5.- Detección del daño**

El daño al ADN se determinó mediante inmunodetección, utilizando Southern blots en donde las muestras de ADN (~2000 ng) de los corales expuestos a RUV, se fijaron mediante vacío a una membrana de nitrocelulosa Protan, utilizando un aparato Bio-Dot (Bio-Rad). Las membranas se saturaron con 1.5% de gelatina en TBS-T (Tris Buffered Saline con 20% Tween) durante una hora a 28° C. Los anticuerpos monoclonales (H3 de ratones, Sigma-Aldrich), se agregaron directamente (1:10,000) y se dejaron incubar durante 16 horas. Las membranas se lavaron con TBS-T por 5 minutos. El anticuerpo secundario (anti-ratón conjugado con la enzima fosfatasa alcalina) se incubó durante dos horas (1:5,000), y se lavó por 5 minutos con TBS-T dos veces. La detección del primer anticuerpo, se efectuó mediante el empleo del kit Immun-Blot AP<sup>®</sup> (Bio-Rad). La membrana se escaneó (Hp Scanjet 4670) y la intensidad de color de cada punto se cuantificó determinando el número de píxeles por unidad de área a través de un programa de análisis de imágenes (Image-J).

#### **V.6.- Cuantificación**

La cuantificación del daño se realizó mediante curvas de calibración, una por cada membrana revelada, conformadas por diluciones seriadas (1:1) del plásmido pUC19 dañado en su totalidad, (Ver anexo I), determinando el número de dímeros mediante la ecuación que describe la relación entre la intensidad de color (número de píxeles) y la cantidad de dímeros correspondiente a cada dilución de plásmido (Fig. 5) (Modificado de Sinha *et al.* 2001).



**Figura 5.-** Ejemplo de una curva de calibración para la cuantificación de dímeros de timina. (A).- Variación en la intensidad de color debida a la variación en la cantidad de pUC19. (B).- Determinación de la ecuación que explica modificaciones en el número de dímeros en función a la intensidad de color.

### V.7.- Densidad de simbioses y Chl *a*

El precipitado obtenido en la extracción de ADN, se resuspendió en 5 ml de agua de mar filtrada y se homogeneizó. El extracto se dividió en dos alícuotas, una para conteo de células, fijándolo con solución de Lugol, y otra para determinación de Chl *a*.

El conteo de células simbioses se efectuó mediante un microscopio y el empleo de un hematocitómetro, contando por triplicado cada muestra (Iglesias-Prieto *et al.* 1992). El número total de células por mililitro (*Cml*) se determinó mediante la ecuación:

$$Cml = (Tc) * (10000\mu) * (FD)$$

En donde *Tc* es el total de células contadas en el cuadrante W (ver anexo II) y *FD* es el factor de dilución.

Para determinar la concentración de Chl *a* la alícuota, se centrifugó durante un minuto a 10,000 rpm, desechando el sobrenadante y enjuagando la pastilla con agua dulce. Posteriormente se agregó 50  $\mu$ l de dimetil-sulfóxido (DMSO) y se mezcló mediante un vórtex, se adicionó 950  $\mu$ l de acetona fría (-20° C) y se homogenizó nuevamente. La muestra se incubó a 4° C durante 12 horas. Pasado este tiempo, se centrifugó a 13,000 rpm

(un pulso). La absorbancia del sobrenadante se midió, a 630 nm, 664 nm y 750 nm mediante un espectofotómetro, usando como blanco una solución de acetona: DMSO (95:5, v:v) y la concentración final de Chl *a* se determinó por medio de las ecuaciones propuestas por Jeffrey y Humphrey (1975) para dinoflagelados.

$$[\text{Chl } a \text{ (mg/m}^{-1}\text{)}] = 11.43 * (D_{664} - D_{750}) - 0.64 * (D_{630} - D_{750})$$

Se estandarizó la concentración de células simbiotes y de Chl *a* en función del área coralina. El área de extracción se determinó por medio de la técnica del papel aluminio (Marsh 1970).

#### **V.8.- Análisis de datos**

Una vez comprobados los supuestos de normalidad, linealidad y homogeneidad de varianza de los datos, se procedió a realizar pruebas t-student con el fin de determinar o dilucidar diferencias entre corales blanqueados y corales pigmentados para la densidad de clorofila *a* y la densidad de simbiotes.

Para cuantificar las posibles diferencias en la formación de dímeros de timina entre corales blanqueados y pigmentados, a lo largo del tiempo (exposición a luz simulada) o entre tratamientos (con RUV y sin RUV en el caso de la exposición a luz natural), se realizó un análisis de varianza de dos vías (ANDEVA); las diferencias entre los grupos se observó mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

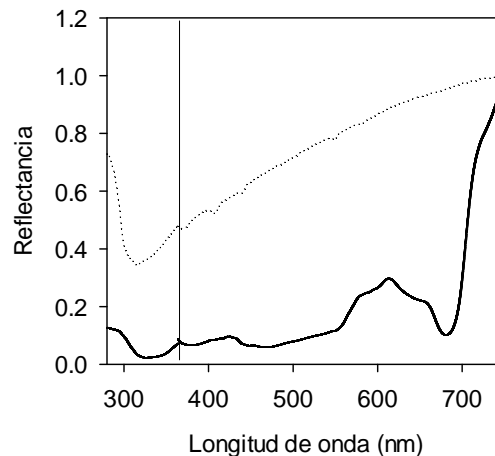
Todas las pruebas estadísticas se realizaron con un nivel de confianza del 95%, utilizando el programa Statistica 7.0 y las gráficas se elaboraron mediante el programa Sigma Plot 10.0.

## VI.- Resultados

### VI.1.- Espectros de reflectancia de corales intactos

Se determinaron los espectros de reflectancia de esqueletos de *O. faveolata* utilizando un fragmento de teflón como un estándar de reflectancia, considerando que este reflejaba el 100% de la luz incidente. Las medidas de reflectancia se efectuaron en un rango de 750 nm hasta 280 nm. Los espectros de reflectancia de esqueletos intactos, mostraron un decremento monotónico a partir de los 750 nm hasta los 300 nm, a partir de esta longitud de onda, el espectro describe un aumento hasta los 280 nm (Fig. 6).

Por otra parte, los espectros de reflectancia de los corales intactos, se determinaron utilizando el esqueleto de coral como blanco. Se observó un espectro similar en el PAR al descrito en trabajos anteriores (Enríquez *et al.* 2005), no obstante en la región UV, la mínima reflectancia se identificó alrededor de los 324 nm.

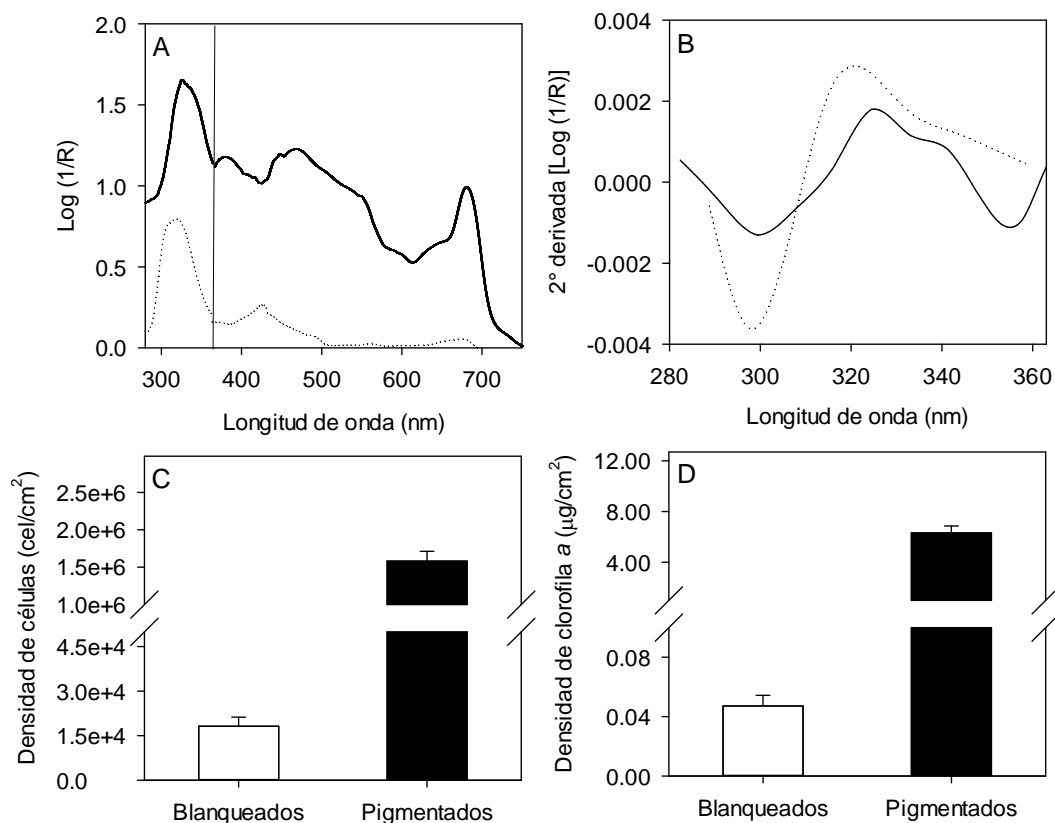


**Figura 6.-** Espectros de reflectancia de *O. faveolata*, en línea discontinua se muestra la reflectancia del esqueleto y en línea continua un coral pigmentado, la línea vertical muestra el cambio de lámparas.

Por su parte, la transformación del espectro de reflectancia al de absorción ( $\text{Log}(1/R)$ , Shibata 1956) de corales blanqueados (Fig. 7 A), mostró una disminución del pico de absorción de la clorofila *a* a 675 nm, resultado del decremento en pigmentación y de simbiontes después del estrés térmico ( $t$ -student  $P < 0.05$ ) (Fig. 7 C, D). Al igual que en el PAR, se observó una disminución en el pico de absorción alrededor de los 324 nm, no

obstante esta no fue tan dramática como a 675 nm: en los corales blanqueados, la absorbancia en el pico de clorofila *a* se redujo en un 94 % mientras que en el pico máximo de absorbancia en el rango del UV se redujo en un 53 % (Fig. 7A), evidenciando la presencia de pigmentos fotoprotectores en corales blanqueados.

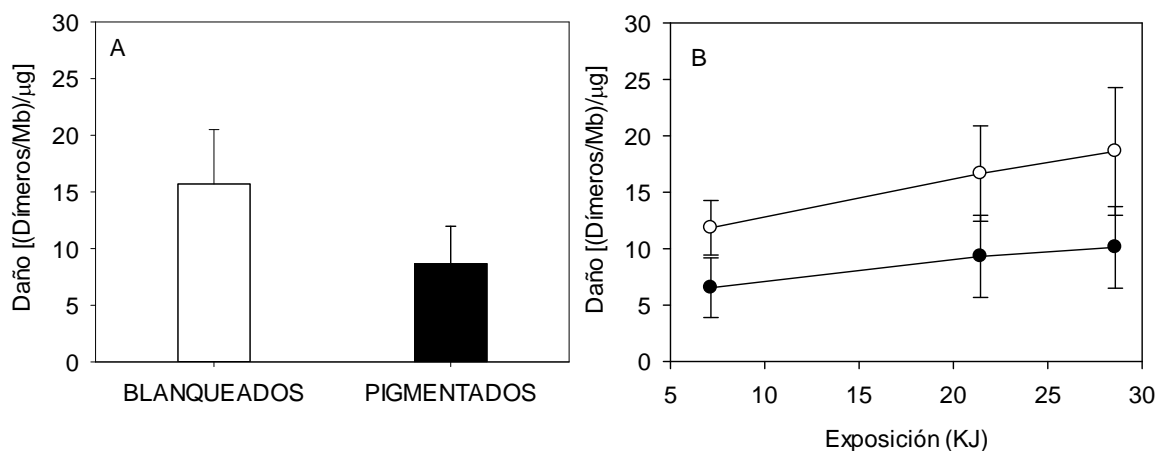
Mediante la segunda derivada (transformada positivamente), se pudo detectar la existencia de al menos dos picos de absorción en el rango de la RUV. El mayor a 324 nm y un pico secundario, menos definido, alrededor de 340 nm. El pico de absorción secundario que se observó en corales pigmentados alrededor de 340 nm, no fue tan evidente en corales blanqueados (Fig. 7 B).



**Figura 7.-** (A).- Comparación de espectros de absorción ( $\text{Log}(1/R)$ ) de corales intactos pigmentados (línea continua) y blanqueados (línea discontinua), la línea vertical muestra el cambio de lámparas. (B).- Segunda derivada de 280 nm a 363 nm, los datos se encuentran transformados positivamente. (C).- Densidad de células simbiotas en corales blanqueados y pigmentados. (D).- Densidad de clorofila *a* en corales blanqueados y pigmentados. ■.- Corales Pigmentados, □.- Corales Blanqueados. (media  $\pm$  D.E).

## VI.2.- Formación de CPDs en *O. faveolata*

Durante la exposición a la radiación simulada, la formación de dímeros de timina [(Dímeros/Mb)/ $\mu\text{g}$ ], tanto en corales blanqueados como en pigmentados, se incrementó paulatinamente de 2 a 8 horas (Fig. 8, Tabla 1). El número de dímeros resultó mayor en los corales blanqueados, respecto a los corales pigmentados (ANDEVA  $P > 0.05$ ) (Fig. 8 A). No obstante, al comparar la formación de dímeros entre estos grupos en los diferentes tiempos de exposición, las diferencias no resultaron significativas (Tukey  $P > 0.005$ ) (Fig. 8 B).

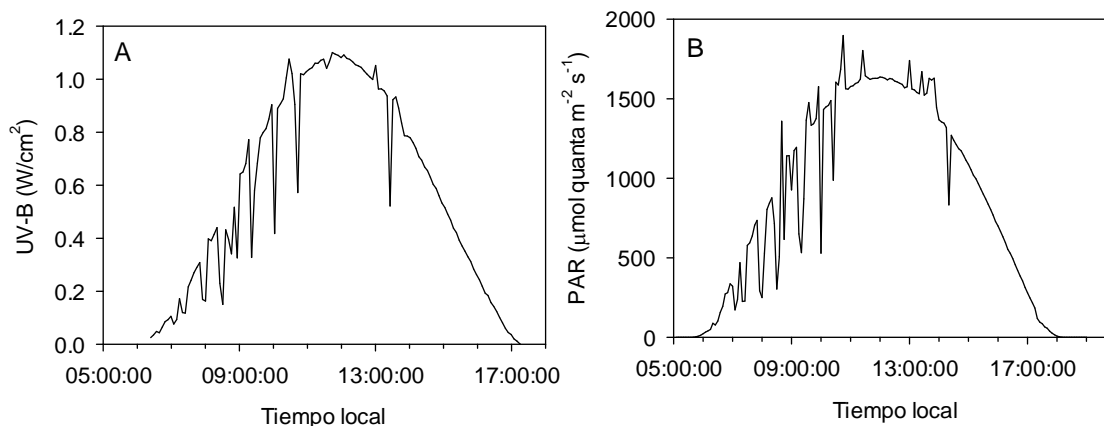


**Figura 8.-** Formación de CPDs en corales intactos blanqueados (símbolo blancos) y pigmentados (símbolos negros). (media  $\pm$  D.E). (A).- Formación de dímeros de timina promedio en corales blanqueados y pigmentados. (B).- Formación de dímeros de timina por exposición.

**Tabla 1.-** Valores integrados de RUV durante las exposiciones a luz solar simulada (300 a 400 nm) y valores promedio de formación de dímeros para corales blanqueados y pigmentados.

Horas de exposición	UV-B ( $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ )	[(Dímeros/Mb)/ $\mu\text{g}$ ]	
		Blanqueados	Pigmentados
2	7.14	11.85	6.54
6	21.43	16.65	9.32
8	28.58	18.62	10.11

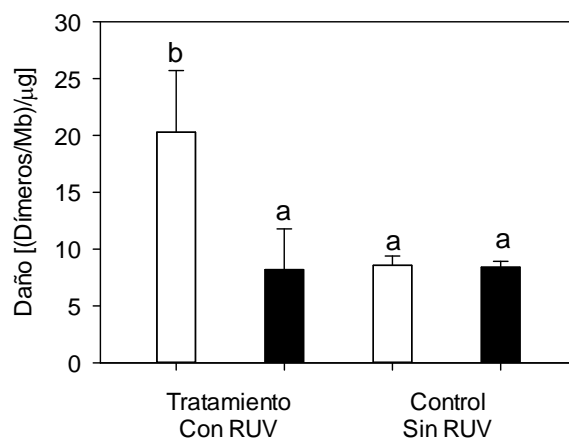
La exposición a radiación natural se realizó el 22 de marzo del 2013, en general, la radiación solar mostró un comportamiento gaussiano, con máximos al medio día solar de  $1897.5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  para el PAR y de  $1.1 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$  para la RUV. Después de nueve horas, se alcanzó una exposición de 21.52 KJ (valor integrado de RUV-B) (Fig. 9, Tabla 2).



**Figura 9.-** Comportamiento de la radiación solar el día de la exposición. (A).- Radiación ultravioleta (valor integrado de 320 a 400 nm, en  $\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). (B).- Radiación fotosintéticamente activa (valor integrado de 300 a 750 nm).

Después de la exposición a radiación solar natural, se encontraron diferencias significativas en la formación de dímeros de timina entre corales blanqueados y pigmentados, así como entre los tratamientos (ANDEVA  $P < 0.05$ ); la formación de CPDs fue mayor en corales blanqueados respecto a los pigmentados en el estanque tratamiento (con RUV) (Tukey  $P < 0.005$ ), no obstante no se encontraron diferencias entre los corales blanqueados y pigmentados en el tratamiento control (sin RUV) (Tukey  $P > 0.005$ ) (Fig. 10, Tabla 2).





**Figura 10.-** Formación de dímeros de timina en corales intactos del tratamiento y en corales control. ■.- Corales pigmentados, □.- Corales blanqueados. Las letras muestran las diferencias significativas. (media + D.E).

**Tabla 2.-** Valores integrados de RUV durante las exposiciones a radiación solar natural (300 a 400 nm) y valores promedio de formación de dímeros para corales blanqueados y pigmentados.

Horas de exposición	UV-B (KJ)	[(Dímeros/Mb)/μg] Blanqueados	[(Dímeros/Mb)/μg] Pigmentados
9	21.52	20.27	8.19

## VII.- Discusión

En la historia evolutiva de los corales, el mayor éxito ecológico de este grupo se ha producido en zonas someras y tropicales donde los organismos están expuestos a grandes radiaciones de luz UV (Banaszak y Lesser 2009). Una de las principales estrategias descritas para contrarrestar los efectos nocivos de la RUV, es la presencia de compuestos fotoprotectores conocidos como MAAs (Banaszak 2003, Banaszak *et al.* 2006). Los picos de absorción de estos aminoácidos varían en un rango de 309 a 360 nm, sin embargo, los espectros de absorción de estos son amplios (aproximadamente 40 nm a 50% de altura del espectro), por lo que la protección que ofrecen es mayor que la descrita por los picos de absorción máxima, no obstante poseen una mínima absorción en el PAR (Banaszak 2003, Banaszak y Lesser 2009).

En el presente trabajo se determinó por medio de la transformación del espectro de reflectancia (Log 1/R) la presencia de estos compuestos, tanto en corales pigmentados así como los blanqueados (Fig. 7 A, B). Los picos de absorción observados a partir del análisis de la segunda derivada podrían corresponder a Microsporina-metilamina-serina ( $\lambda_{\max}$  325 nm) y ácido paliténico (Palythenic acid) ( $\lambda_{\max}$  337 nm) (Kobayashi *et al.* 1981, Teai *et al.* 1997). Sin embargo, no se pudo realizar la identificación bioquímica de estos compuestos, por lo que el análisis espectral es una manera indirecta de evidenciar la presencia de MAAs (Banaszak 2003).

Los resultados de este estudio indican, sin embargo, que en los corales blanqueados, la presencia de MAAs no fue suficiente para proteger al hospedero de la formación de dímeros (Fig. 8 A, B); nuestros resultados confirman que la pérdida de simbiontes supone un incremento en la formación de CPDs en corales blanqueados, indicando que el principal agente fotoprotector contra la radiación ultravioleta que posee el hospedero lo constituyen las mismas algas.

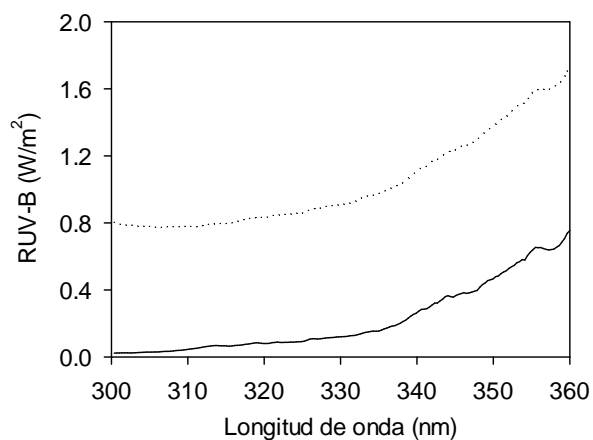
La formación de dímeros de timina en el estanque control (sin RUV), por una parte pudiera estar explicada por la producción de ROS, producto de foto daño en el aparato fotosintético de las algas simbiotes ante un exceso de luz en el rango visible (Lesser 2006). Estas especies reactivas pueden haber sido traslocadas al hospedero (Lesser 1997). Por otro lado, la actividad de la enzima involucrada en el principal mecanismo de reparación de CPDs, la fotoliasa (Brettel y Byrdin 2010) posee un rango de absorción de

370 a 420 nm (Sancar 2003), justo en el rango de absorción del filtro utilizado para bloquear el efecto de la RUV en el estanque control (Fig. 4). Por tanto, bloquear la presencia de UV en este rango pudiera haber además inhibido total o parcialmente la actividad de la fotoliasa en los organismos control.

La presencia de un esqueleto que facilite el esparcimiento de PAR y con ello el incremento en la eficiencia de absorción, ha dotado a los corales de una ventaja evolutiva que pudiera explicar que sean los organismos dominantes en aguas oligotróficas tropicales. No obstante, el efecto del esparcimiento de RUV, involucra un incremento significativo en la formación de dímeros de timina. De acuerdo con el modelo propuesto por Enríquez *et al.* (2005), la absorción de luz que podría experimentar una partícula pequeña, como el ADN, sobre una superficie plana totalmente reflectora, estaría descrito de la forma:

$$E\sigma = E + 2(R)$$

En donde  $E\sigma$  corresponde al incremento en la absorción debido al esparcimiento,  $E$  corresponde al valor de irradiancia de la fuente y  $R$  corresponde a la reflectancia de la superficie. Si bien la superficie del coral es mucho más compleja (por lo que se subestima el verdadero valor de la absorción), este modelo permite realizar una aproximación del incremento en la absorción de RUV por parte del holobionte (Fig. 12), evidenciando la importancia del esqueleto coralino.



**Figura 111.-** Espectro del simulador solar en la región ultravioleta (línea continua). Aproximación del incremento debido a la reflectancia del esqueleto coralino (línea discontinua).

Enríquez *et al.* (2005) cuantificaron incrementos hasta de 5 veces en la absorción de luz para la especie *Porites branerri*. En este trabajo no se ha podido cuantificar el efecto del esqueleto sobre la amplificación de la absorción de luz UV, pero sí sobre su impacto negativo sobre el ADN del hospedero. El efecto del esqueleto en el esparcimiento múltiple de la luz ha proporcionado a los corales una ventaja evolutiva, pero adicionalmente los ha conferido de una fragilidad inherente. En este sentido, la eficiencia en la absorción de luz, juega un doble papel, mientras que la porción correspondiente al PAR es benéfica e indispensable para la fotosíntesis, la RUV es nociva. Esta propiedad del esqueleto coralino, se vuelve particularmente importante en ausencia o reducción de las densidades de simbiontes (principal agente fotoprotector), provocando un incremento en la formación de dímeros, por la ausencia de simbiontes, y una amplificación del daño al ADN por efecto del esparcimiento múltiple de la RUV.

La presente investigación es la primera que pone en evidencia el papel fotoprotector de las algas simbiontes contra la RUV, incorporando un componente más a los beneficios e importancia de la relación simbiótica entre corales y dinoflagelados. Por otro lado, comprueba la fragilidad de los corales debida a la eficiencia con la que se absorbe la luz en todas las longitudes de onda y en especial de la RUV.

## **VIII.- Conclusión**

Los resultados obtenidos en la presente investigación, demuestran que las altas densidades de simbiontes actúan como una capa fotoprotectora que reduce la disponibilidad de RUV para el hospedero. Por lo que durante un evento de blanqueamiento, la pérdida de simbiontes induciría un fuerte incremento de la absorción de RUV por parte del hospedero, aumentando la vulnerabilidad de éste ante los efectos nocivos de la RUV; como la formación de dímeros de timina en el ADN. La propiedad fotoprotectora de los simbiontes cobra especial importancia ante el aumento en la frecuencia e intensidad de los eventos de blanqueamiento, evidenciando que las adaptaciones de los corales a la RUV como la presencia de MAAs, no serán suficientes para prevenir el daño causado por la RUV en el actual escenario de cambio global.

## IX.- Referencias

- Anderson S., R. Zepp, J. Machula, D. Santavy, L. Hansen y E. Mueller. 2001. Indicators of UV Exposure in Corals and Their Relevance to Global Climate Change and Coral Bleaching. *Human and Ecological Risk Assessment*: 7:1271-1282.
- Banaszak A. T. 2003. Photoprotective physiological and biochemical responses of aquatic organisms. Pp:329-356. *En*: Helbling E. W. y Zagarase H. (eds.), UV effects in aquatic organisms and ecosystems. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Banaszak A. T. 2007. Optimization of DNA extraction from a scleractinian coral for the detection of thymine dimers by immunoassay. *Photochem. Photobiol.* 83:833–838.
- Banaszak A. T. y M. P. Lesser. 2009. Effects of solar ultraviolet radiation on coral reef organisms. *Photochem. Photobiol. Sci.* 8:1276–1294.
- Banaszak A. T. y P. J. Neale. 2001. Ultraviolet radiation sensitivity of photosynthesis in phytoplankton from an estuarine environment. *Limnol. Oceanogr.* 43:592-603.
- Banaszak A. T. y R. K. Trench. 1995. Effects of ultraviolet (UV) radiation on marine microalgal invertebrate symbioses. II. The synthesis of mycosporine-like amino acids in response to exposure to UV in *Anthopleura elegantissima* and *Cassiopeia xamachana*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 194:233-250.
- Banaszak A. T., M. G. Barba Santos, T. C. LaJeunesse, y M. P. Lesser. 2006. The distribution of mycosporine-like amino acids (MAAs) and the phylogenetic identity of symbiotic dinoflagellates in cnidarian hosts from the Mexican Caribbean. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 337:131-146.
- Brettel K. y M. Byrdin. 2010. Reaction mechanisms of DNA photolyase. *Current Opinion in Structural Biology.* 20:693-701.
- Dahms H. U. y J. S. Lee. 2010. UV radiation in marine ectotherms: Molecular effects and responses. *Aquat. Toxicol.* 97:3–14.
- Done T. J., J. C. Ogden, W. J. Wiebe y B. R. Rosen. 1996. Biodiversity and ecosystem function of coral reefs, pp. 393-429. *En*: Functional Roles of Biodiversity: A Global Perspective. Mooney H. A., J. Hall Cushman, E. Medina, O. E. Sala y E.-D. Schulze (Eds). John Wiley & Sons, EUA.

- Dunlap W. C. y B. E. Chalker. 1986. Identification and quantitation of near-UV absorbing compounds (S-320) in a hermatypic scleractinian. *Coral Reefs*. 5:155–159.
- Enríquez S., E. R. Méndez y R. Iglesias-Prieto. 2005. Multiple scattering on coral skeleton enhances light absorption by symbiotic algae. *Limnol. Oceanogr.* 50(4):1025-1032.
- Fitt W. K., F. K. McFarland, M. E. Warner, y G. C. Chilcoat. 2000. Seasonal patterns of tissue biomass and densities of symbiotic dinoflagellates in reef corals and relation to coral bleaching. *Limnol. Oceanogr.* 3:677–685.
- Fitt W. K., R.D. Gates, O. Hoegh-Guldberg, J. C. Bythell, A. Jatkari, A. G. Grottoli, M. Gomez, P. Fisher, T. C. LaJuenesse, O. Pantos, R. Iglesias-Prieto, D. J. Franklin, L. J. Rodrigues, J. M. Torregiani, R. van Woesik, y M. P. Lesser. 2009. Response of two species of Indo-Pacific corals, *Porites cylindrica* and *Stylophora pistillata*, to short-term thermal stress: The host does matter in determining the tolerance of corals to bleaching. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 373:102–110.
- Gleason D. F. y G. M. Wellington. 1995. Variation in UVB sensitivity of planula larvae of the coral *Agaricia agaricites* along a depth gradient. *Mar. Biol.* 123:693–703.
- Harland A. D., P. D. Spencer y L. M. Fixter. 1992. Lipid content of some Caribbean corals in relation to depth and light. *Mar. Biol.* 113:357-361.
- Häder D.-P., H. D. Kumar, R. C. Smith y R. C. Worrest. 1998. Effects on aquatic ecosystems. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 46:53–68.
- Häder D.-P., D. Kumar, R. C. Smith y R. C. Worrest. 2007. Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochem. Photobiol. Sci.* 6: 267-285.
- Helbling E. W., V. E. Villafañe, M. Ferrario y O. Holm-Hansen. 1992. Impact of natural ultraviolet radiation on rates of photosynthesis and on specific marine phytoplankton species. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 80:89-100.
- Iglesias-Prieto R., J. L. Matta, W. A. Robins y R. K. Trench. 1992. Photosynthetic response to elevated temperature in the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:10302- 10305.
- Jeffrey S. W. y G. F. Humphrey. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c1* and *c2* in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 167: 191-194.

- Jokiel P. L. 1980. Solar ultraviolet radiation and coral reef epifauna. *Science* 207:1069-1071.
- Jokiel P. L. y R. H. York. 1982. Solar ultraviolet photobiology of the coral *Pocillopora damicornis* and symbiotic zooxanthellae. *Bulletin of Marine Science*. 31:301-315.
- Jordán Dahlgren E. 1993. Atlas de los arrecifes coralinos del Caribe Mexicano, Parte I. El sistema continental. Centro de Investigaciones de Quintana Roo, Chetumal, . México. 110 pp.
- Kobayashi J., H. Nakamura y Y. Hirata. 1981. Isolation and structure of a UV-absorbing substance 337 from the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Tetrahedron Lett.* 22:3001-3002.
- Lesser M. P. 1997. Oxidative stress causes coral bleaching during exposure to elevated temperatures. *Coral Reefs* 16:87-192.
- Lesser M. P. 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annu. Rev. Physiol.* 68: 253-278.
- Lesser M. P. y J. H. Farrell. 2004. Exposure to solar radiation increases damage to both host tissues and algal symbionts. *Coral Reefs* 23:367-377.
- Lesser M. P. y S. Lewis. 1996. Action spectrum for the effects of UV radiation on photosynthesis in the hermatypic coral *Pocillopora damicornis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 134: 171-177.
- Lesser M. P. y J. M. Shick 1989. Photoadaptation and defense against oxygen toxicity in zooxanthellae from natural populations of cnidarians. *J. Ex. Mar. Biol. Ecol.* 134:129-141.
- Marsh J. A. 1970. Primary productivity of reef building calcareous algae. *Ecology* 51: 255-263.
- Moberg F. y C. Folke. 1999. Ecological goods and services of coral reef ecosystems. *Ecological Economics.* 29:215-233.
- Muscantine L. 1967. Glycerol excretion by symbiotic algae from corals and *Tridacna* and its control by the host. *Science* 156:516-519.
- Muscantine L. y V. Weis. 1992. Productivity of zooxanthellae and biogeochemical cycles. Pp. 257-272. En: *Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea.*

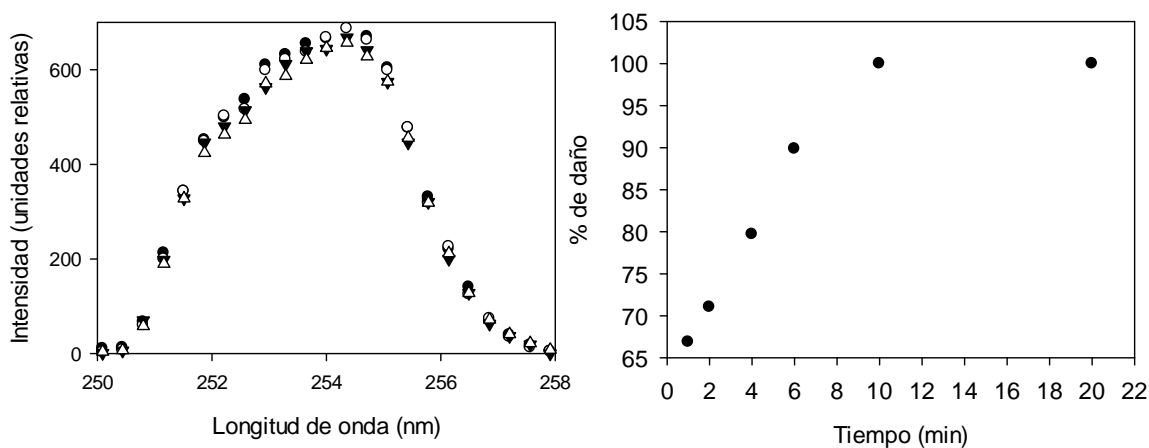


- Falkowski, P. G. y A. D. Woodhead (Eds.) Environmental Science Research V. 43. Plenum Press, New York. .
- Neale P. J, J. J. Cullen y R. F. Davis. 1998. Inhibition of marine photosynthesis by UV radiation: variable sensitivity of phytoplankton in the Weddell-Scotia Confluence during the austral spring. *Limnol. Oceanogr.* 43:433–448.
- Reaka-Kudla M. L. 1997. The Global Biodiversity of Coral Reefs: A Comparison with Rain Forests. En: Biodiversity II, M. L. Reaka-Kudla, D. E. Wilson, E. O. Wilson, Eds. (Joseph Henry Press, Washington, DC, 1997), pp. 83-108.
- Sancar A. 2003. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chem. Rev.* 103:2203-2237.
- Shibata K. 1969. Pigments and a UV-absorbing substance in corals and a blue-green alga living in the Great Barrier Reef. *Plant Cell Physiol.* 10:325-335.
- Sinha R. P., M. Dautz y D.-P. Häder. 2001. A simple and efficient method for the quantitative analysis of thymine dimers in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae. *Acta. Protozool.* 40:187-195.
- Smith F. G. W. 1948. Atlantic Reef Corals, A Handbook of the Common Reef and Shallow-Water Corals of Bermuda, The Bahamas, Florida, The West Indies and Brazil. University of Miami Press, Coral Gables. USA. 111 pp.
- Stanley, Jr. G. D. y Peter K. Swart. 1995. Society Evolution of the Coral-Zooxanthellae Symbiosis During the Triassic: A Geochemical Approach. *Paleobiology.* 21:179-199.
- Teai T., P. Raharivelomanana, J.-P. Bianchini, R. Faure, P. M. V. Martin, A. Cambon. 1997. Structure de deux nouvelles iminomycosporines isolées de *Pocillopora eydouxi*. *Tetrahedron Lett.* 38:5799–5800.
- Torres J. L., R. A. Armstrong y E. Weil. 2008. Enhanced ultraviolet radiation can terminate sexual reproduction in the broadcast species *Acropora cervicornis* Lamarck, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 358:39-45.
- Trench R. K. 1979. The Cell Biology of Plant-Animal Symbiosis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 30:485-531.
- Veron J. E. N. 2000. Corals of the world. Australian Institute of Marine Science, Townsville, Australia, Vol.1. 463 pp.

Whitehead R. F., S. J. de Mora y S. Demers. 2000. Enhanced UV radiation—a new problem for the marine environment. En: de Mora S., S. Demers y M. Vernet (eds.) *The Effects of UV radiation in the Marine Environment* pp. 1–34. Cambridge University Press, Cambridge.

## Anexo I.- Exposición de pUC19 a UV-C y determinación de CPDs formados

Para la curva de calibración, se realizó una exposición del plásmido obtenido (pUC 19) a RUV-C por 60 minutos, con el fin de garantizar la formación del máximo número de dímeros de timina por plásmido. En la figura se muestra el espectro de la lámpara de RUV-C (izquierda), tomado a diferentes tiempos (15, 30, 45, y 60 minutos de exposición), se aprecia que el espectro de la lámpara no cambia durante la exposición. De igual manera, se muestra, la curva del máximo daño obtenido (derecha).



Considerando, que durante la exposición se formó la máxima cantidad de dímeros posibles en la estructura de pUC19, el número de dímeros de timina en las diferentes cantidades (nanogramos) de plásmido utilizado, se determinó de la siguiente forma:

$$\text{Dímeros/Mb} = [(M \cdot T^{\wedge}T/\text{ng})/2686]/10^6$$

donde Dímeros/Mb es el número de dímeros de timina por megabase, M es la cantidad de ADN en nanogramos utilizada en la exposición y  $T^{\wedge}T/\text{ng}$  es el número de dímeros por nanogramo. El número de dímeros por nanogramo de pUC19 se determinó mediante el peso molecular del plásmido y la secuencia genética del mismo, esta se muestra a continuación.

Secuencia de pUC 19 en negritas se resaltan los posibles espacios para la formación de CPDs.

1 tcgcgcg**ttt** cggatgatgac ggt**aaa**acc tctgacacat gcagctccc gagacggtca  
61 cagct**tt**gtct **gta**agcggat gccgggagca gac**aa**ccccg tcagggcgcg tcagcggggtg  
121 **tt**ggcggggtg tcggggctgg **ctta**actatg cggcatcaga gcagat**tt**gta ctgagagtgc  
181 accatatgcg gttg**aa**ata ccgcacagat gcg**ta**aggag **aaa**ataccgc atcagcgcc  
241 **att**cgcc**att** caggctgcgc **aact**g**tt**ggg **aag**ggcgatc ggtgcgggcc **tctt**cgtat  
301 tacgccagct ggcg**aa**aggg ggatgtgctg **ca**aggcg**att** **aa**g**tt**gggta acgccagggt  
361 **ttt**eccagtc acgacg**tt**gt **aaa**acgacgg ccag**ta**att cgagctcggg acccggggat  
421 cctctagagt cgacctgcag gcatg**ca**agc **tt**ggcg**ta**at catggtcata gctg**ttt**ct  
481 gttg**aa**att **gtt**atcgcct cac**aa**ttcca cac**aa**catag gagccg**aa**g cata**aa**agt  
541 **aa**agcctggg gtgc**ct**aatg agtgagct**aa** ctcac**att**aa **tt**gc**tt**gcg ctcactgcc  
601 gct**ttt**cagt cggg**aa**acct gtcgtccag ctgc**att**aat **gaa**tcggcca acgcgcgggg  
661 agagcg**gtt** tgcg**tt**gg gcgct**ttt**c gct**tt**cctcgc t**act**gactc gctgcgctc  
721 gtc**ttt**ggc tgcggcgagc ggtatcagct cact**aa**agg cgg**ta**atacg **gtt**atccaca  
781 **gaa**tcagggg at**aa**cgcagg **aa**agaacatg tgag**aaaa**g gccag**aaaa** ggccag**gaa**c  
841 cgt**aaaa**agg ccgc**gtt**gct ggcg**tttt**c cataggetcc gccccctga cgagcatcac  
901 **aaaa**atcgac gct**aa**gtca gaggtggcga **aa**cccgcag gactata**aa**g ataccaggcg  
961 **ttt**cccctg **gaa**gctcct cgtgcgctct cctg**ttt**ccga cctgcccgt taccggatac  
1021 ctgtecgcct **ttt**ccc**ttt**c ggg**aa**gcgctg gcgct**ttt**c atagctcac ctgtaggtat  
1081 ctcag**ttt**gg ttaggtcgt tcgctcc**aa**g ctgggctgtg tgcacg**aa**cc ccccg**tt**cag  
1141 cccgaccgt gcgc**ttt**atc cgg**ta**actat cgt**ttt**gagt cca**aa**cccggg **aa**gacacgac  
1201 **tt**atgccac tggcagcagc cactg**gta**ac aggattagca gagcgagga ttaggcggt  
1261 gctacagagt **tttg**aaagt gtggc**ctaa**c tacggctaca ctag**aa**g**aa**c agt**ttt**ggt  
1321 atctgcgctc tgtg**aa**gcc ag**tt**ac**ttt**c gg**aaaa**agag **tt**gtagctc **tt**gatccgc  
1381 **aa**ac**aa**acca ccgctgtag cgtg**gtttt** **ttt**g**ttt**gca agcagcagat tacgcgca  
1441 **aaaa**aggat ct**aa**g**aa**ga tct**tt**gac **ttt**ctacgg ggtctgacgc tcagt**gaa**c  
1501 **gaaa**actcac **gtta**agggat **ttt**gctatg agat**ta**caa **aa**aggat**ctt** cacctagatc  
1561 **cttt**aa**att** **aaaa**at**gaa**g **ttt**aaatca atct**aa**agta tatatgagta **aact**ggtct  
1621 gacag**tt**acc **aat**g**tt**aat cagtgaggca cctatctcag cgatctgct **attt**c**gtt**ca  
1681 tccatag**ttg** cctgactccc cgtcgtgtag at**aa**ctacga tacgggaggg **ctt**accatct  
1741 ggcccagtg ctg**ca**atgat accgcgagac ccacgctcac cggctccaga **ttt**atcagca  
1801 at**aa**accagc cagccg**aa**g ggcgagcgc ag**aa**gtggtc ctg**ca**act**tt** atccgctcc  
1861 atccagtcta **tta**att**gtt**g cggg**aa**gct agag**ta**agta **gtt**cgccagt **ta**atag**ttg**  
1921 cg**aa**ac**gtt**g **tt**gccat**tt**gc tacaggcacc gtggtgtcac gctcgtc**tt** ttgatatgct  
1981 tcattcagct ccg**ttt**ccca acgat**ca**agg cgag**tt**acat gatccccat **gtt**gtg**ca**aa  
2041 **aa**agcgg**tt**a gtc**ctt**cgg tctccgac **gtt**gtcag**aa** **gta**ag**tt**ggc cgcagt**gt**ta  
2101 t**act**catgg **tt**atggcagc actgcataat tct**tt**actg tcatgccac **gta**agatgc  
2161 **ttt**ctgtga ctggtgagta ct**aa**cc**aa**g t**att**ctgag **aat**agtgtat gcggcgaccg  
2221 ag**tt**gct**tt** gcccggcgtc **aa**acgggat **aa**taccgcgc cacatagcag **aactt**aaaa  
2281 gtgctcatca **ttg**aaaacg **ttctt**gggg cg**aaaa**ctct **ca**aggat**ctt** accgct**gtt**g  
2341 agatccag**tt** cgat**gta**acc cactcgtgca cc**aa**actgat **ctt**cagcacc **tttt**act**ttt**c  
2401 accagc**gtt** ctgggtgagc **aaaa**acagga aggc**aaa**atg ccg**aaaa**aa ggg**aa**ataagg  
2461 gcgacacgga **aat**g**tt**g**aa**t actcactc **ttc**tt**ttt**c **aat**att**tt**g **aag**catt**tt**at  
2521 cagg**gtt**att gctcagtag cggatacata **ttg**aatgta **tt**ag**aaaa** taaac**aa**ata  
2581 gggg**ttt**cgc gcac**ttt**cc ccg**aaaa**gtg ccactgacg t**ta**g**aa**aac **catt**attatc  
2641 atgac**tt**aa cctata**aaaa** tagcgctac acgagccct **tt**cgtc

Anexo II.- Representación gráfica de la cámara de Neubauer; se muestran los campos W

